

Feel so Bio キットシリーズ

#004 DNA 切断 キット

取扱説明書



1-100-004

目次

本キットの特徴	… 2
キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧	… 3
内容物について	… 4
事前準備	… 6
実験手順	… 9
指導のポイント	… 11
片付け	… 12
付録 1 制限酵素について	… 13
付録 2 電気泳動法の原理	… 14
付録 2 予想されるバンド	… 17
付録 3 いろいろな制限酵素	… 18
付録 4 マイクロピペットの使い方	… 19
付録 5 DNA 観察の推奨方法	… 20

本キットの特徴

本キットは、遺伝子工学において最も重要な働きを持つ酵素のひとつ、「制限酵素」について学ぶキットです。

ラムダ・ファージの DNA を、特定の塩基配列を認識して DNA を切断する酵素「制限酵素」で処理することにより、DNA が短い断片に切断されます。その結果を電気泳動法を使って確認します。

本キットは、Feel so Bio キットシリーズ #005「DNA 結合キット」とセットで実験を行うことにより、現在の遺伝子工学で中心的な技術となっている遺伝子のクローニング技術について学習することが可能です。

キット使用時に必要な試薬機材の一覧

キット内容【4人1班、実験は2人1組を推奨】

・ラムダ DNA 溶液	110 μ l
・制限酵素 <i>Hind</i> III	20 μ l
・制限酵素バッファー	20 μ l
・精製水	20 μ l
・ローディングバッファー	110 μ l
・DNA マーカー	60 μ l
・40 倍濃縮電気泳動バッファー	25 ml
・アガロース	2 g
・マイクロチューブ (50 本)	1 袋
・取扱説明書 (本書)	1 冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・精製水	975 ml
・氷	500 g 程度
・マイクロピペット 20 μ l 用	5 本(各班 1 本)
・マイクロピペット用チップ	5 箱(各班 1 箱)
・電気泳動槽	1～2 個

ミニゲルを 2 個泳動できる個数をご用意下さい。

・37℃恒温槽	1 台
・フロート	5 個(各班 1 個)
・蛍光観察フィルム(黄色)	
・青色 LED ライト	

※機材につきましては弊社で販売およびレンタル(有料)を行っております。ご入用の際にはお問合せください。

内容物について

ラムダ DNA 溶液

ラムダ・ファージ由来の DNA であるラムダ DNA を含む溶液です。DNA の分解を防ぐ目的で TE バッファーに溶解してあります。必ず氷上で融解し、使用時も氷上に静置してマイクロチューブを温めないようご注意ください。また、使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。

制限酵素

Haemophilus influenzae Rd.由来の制限酵素 *Hind* III です。酵素は常温では短時間で失活しますので、必ず-20℃にて保存してください。制限酵素は使用時には必ず氷上に置き、チューブを温めないようご注意ください。使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。本酵素は、37℃で最も高い DNA 切断活性を示します。

制限酵素バッファー

制限酵素 *Hind* III が最も高い DNA 切断活性を発揮するように調製されたバッファーです。-20℃にて保存してください。10 倍に濃縮されておりますので、反応溶液の 1/10 量を使用ください。

＜組成＞Tris-HCl 6mM、MgCl₂ 6mM、NaCl 100mM、DTT 1mM、
(37℃における pH は 7.5)

精製水

DNA 分解酵素、RNA 分解酵素が含まれていない精製水です。-20℃にて保存してください。

DNA マーカー

ラムダ・ファージの DNA を予め、*Hind*III と *Eco*RI という制限酵素で処理し、複数の断片に切断したものです。生じる DNA 断片の長さは既知であるため、これらの断片はサンプル DNA の長さを推定する目安となります。-20℃にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNA サンプルを電気泳動する際に使用します。−20 °C にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。色素を含み、衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。

また、このローディングバッファーには泳動後の DNA 観察のための DNA 染色試薬が含まれています。蛍光色素ですので、できれば暗所にて保存をしてください。

40 倍濃縮電気泳動バッファー

40 倍の濃度に濃縮した TAE (トリス-酢酸-EDTA) バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNA サンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4°C にて保管してください。電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水で 40 倍に希釈してご使用ください。

事前準備

本実験キットでは 4 人 1 班(実験は 2 人 1 組)を推奨しています。

1 班分の試薬・機材

制限酵素処理実験

▪ ラムダ DNA	20 μ l
▪ 制限酵素 <i>Hind</i> III	3 μ l
▪ 制限酵素バッファー	3 μ l
▪ 精製水	3 μ l
▪ マイクロピペット 20 μ l 用	1 本
▪ マイクロピペット用チップ	1 箱
▪ 空の 1.5ml マイクロチューブ	2 本
▪ 氷水	適量

電気泳動実験

▪ ローディングバッファー	21 μ l
▪ DNA マーカー	10 μ l
▪ DNA 染色液	適量(ゲルが浸る程度)
▪ マイクロピペット 20 μ l 用	1 本
▪ マイクロピペット用チップ	1 箱
▪ 恒温槽	1 台
▪ 40 倍濃縮電気泳動バッファー	300 ml (40 倍希釈後)
▪ 電気泳動槽	1～2 台
▪ アガロースゲル(8 穴)	2 個

※使用する電気泳動槽により必要量が変わります。本実験では、株式会社アドバンスの電気泳動槽、Mupid-2 Plus の使用を想定しております。この商品はアガロースゲル(8 穴)を 2 枚同時に泳動することが可能です。

制限酵素実験の準備

1) 試薬の準備

試薬をマイクロチューブに所定の量に分けたものを、班数分を用意します。内容物が微量なため、マイクロチューブの蓋についていることがございます。その際には、手で振ってマイクロチューブの底に溶液を集めてからご使用ください。

試薬は実験直前まで 4°C にて保管してください。

2) 恒温槽の準備

授業開始前に恒温槽に水を入れ、37°C にセットして温めておきます。

電気泳動実験の準備

1) 電気泳動(1×TAE)バッファの作成

40 倍濃縮泳動バッファ 25 ml を 975 ml の水で 40 倍に希釈します。本キットで使用を推奨している電気泳動槽 Mupid-2 Plus では、電気泳動バッファを約 300 ml/台(ゲルが浸る程度) 使用します。

2) アガロースゲルの作製

a. 300 ml の三角フラスコに 1.4 g のアガロースを入れ 1) で作成した電気泳動バッファ 200 ml を加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は水蒸気によるやけどの危険性がありますので、必ず指導者が行なってください。軍手の上にビニール手袋をして作業を行うことで火傷の危険性を下げることができます。

b. 溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。a. で融解したアガロースを、50 °C 程度まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作製するためのコームを差

し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。

※ゲルトレイの低い方の壁の 2/3 程度の高さを目安としてゲルを流し込みます。

※ 200 ml のアガロース溶液で、小さいゲルが約 8 枚、大きなゲルでは 4 枚作製できます。ゲルメーカーが 1 個しかない場合で、小さいゲルを 4 枚以上作製したいときには、a. のステップで、0.7 g のアガロースを 100 ml の電気泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作製を行ってください。電気泳動槽 1 台で行う場合は、17 ウェルのゲルを 1 枚作成し、1 班 3 ウェルずつ使用します。また、一度固まってしまったゲルでも、再度温めることで溶解し、ゲルを作製することが可能です。

作製したアガロースゲルは、希釈後の電気泳動バッファーに浸した状態で 1 ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

3) 試薬の準備

マイクロピペットを使って、DNA マーカー溶液を 10 μl 、ローディングバッファーを 21 μl ずつマイクロチューブに分けます。

実験手順

制限酵素実験手順

- 1) 恒温槽を 37°C にセットします。
- 2) 氷上でラムダ DNA 溶液、制限酵素バッファー、精製水を融解させます。
- 3) マイクロチューブに制限酵素バッファー 1 μ l、ラムダ DNA 溶液 8 μ l を入れ、マイクロピペットで均一に混ぜあわせます。この混合溶液を各班につき 2 本ずつ作成し、マイクロチューブの蓋に一方は「+」他方には「-」と油性ペンで記入します。
- 4) 3) で作成した混合溶液を氷上で 5 分間、静置してください。
- 5) 各班 2 本のマイクロチューブ「+」には *Hind* III を 1 μ l 加え、「-」には精製水 1 μ l を加えてください(※)。それぞれの混合溶液はマイクロピペットで均一になるよう混ぜあわせてください(注:*Hind* III を入れたマイクロチューブは、必ず氷上に置いて作業してください。使用後は速やかに -20°C へ移動してください)。
- 6) フローターにチューブをさし、37°C の恒温槽へ移して 30~60 分間静置してください(注:室温でも酵素反応は可能ですが、酵素の活性が弱くなるため切断が不完全になったり、切断の確認が難しくなる可能性がありますのでご了承ください)。

※ 「-」のように、制限酵素を加えないサンプルを調整することで、制限酵素による作用を確かめることができます。制限酵素は十分量ございますので、両方のチューブに制限酵素を加えることも可能です。

電気泳動実験の手順

1) 電気泳動槽の準備

電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェル(穴)が来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルが電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください(参考:Mupid-2Plus では約 300 ml 程度)。

2) DNA サンプルの調製

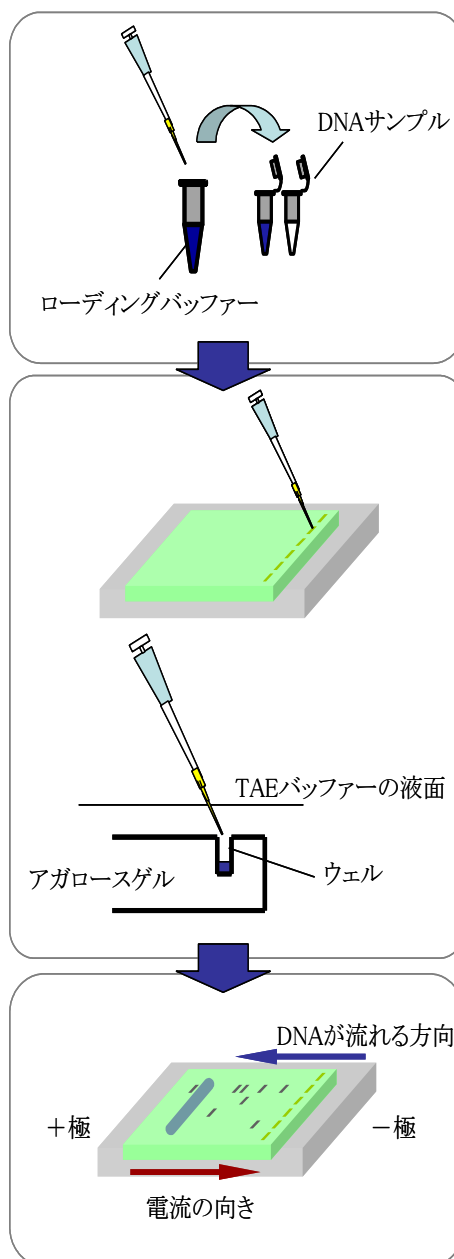
本キット添付のローディングバッファーを 3 μ l ずつ反応の終了した DNA サンプルに加えよく混ぜます(合計 13 μ l)。DNA マーカーにも 3 μ l のローディングバッファーを加えてよく混ぜてください。混ぜたら、5 分間、室温もしくは氷上で静置してください。

3) DNA サンプルの注入(アプライ)

DNA サンプルを別々のウェルにアプライします。アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

4) アガロースゲル電気泳動

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNA はプラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください(参考:Mupid-2 Plus での電気泳動条件は 100 ボルトで 20 分程度)



指導のポイント

制限酵素実験

- 1) 制限酵素は失活しやすいので、マイクロチューブを持つ際に手で試薬を温めないように注意して下さい。また、制限酵素が入ったチューブに強い衝撃を与えないようにして下さい。
- 2) 少量の溶液を扱うので、マイクロピペットで吸った際にきちんと試薬が取れているかどうかを目で確認するようにして下さい。
- 3) DNA 溶液、制限酵素、バッファーなどを反応用チューブに入れたあと、しっかりと混合して下さい。混合の手段として、片方の手でチューブの上の方を持ち、もう一方の手の指で軽く数回チューブの先端をはじくタッピングや、マイクロピペットで溶液を何度か出し入れするピペッティングなどがあります。
- 4) 試薬や器具が、目や口に入らないよう注意して下さい。

電気泳動実験

- 1) DNA を注入するためのウェルは非常に小さいため、初めて電気泳動を行う場合は、マイクロピペットのチップを刺してゲルに穴を開けてしまったり、うまく DNA サンプルを入れられずに失敗したりする可能性があります。ゲルを多めに作っておき、実験前に手で触って固さを確かめさせたり、水で希釈したローディングバッファーを使って注入の練習をさせたりするといいいでしょう。
- 2) アガロースゲルはもろく割れやすいため、扱いには注意が必要です。

片付け

- 1) 余った試薬類は、普通ゴミとして廃棄可能です。
- 2) 使用したチップやチューブはそのまま廃棄するとゴミ袋が破れてしまう可能性があるので、二重にした小さな袋などにまとめて、プラスチックゴミとして廃棄して下さい。
- 3) 使用済みの電気泳動バッファーは、水道に流して捨てることができます。
- 4) 使用後のアガロースゲルは、袋などに密封して可燃ゴミとして廃棄できます。

付録 1 制限酵素について

細菌から発見された制限酵素

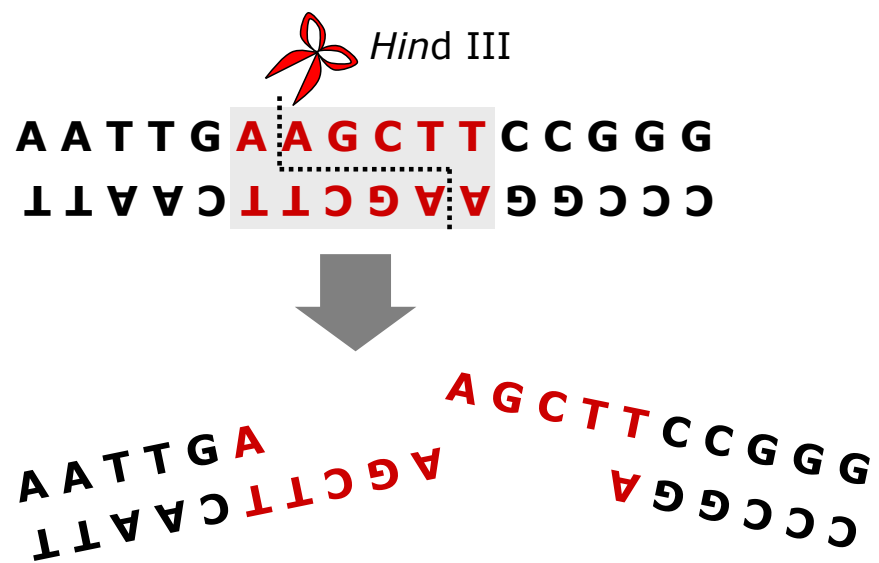
制限酵素は最初、大腸菌から発見されました。細菌にはウイルス(ファージ)に感染されたときに、ファージの増殖を抑える(制限する)働きがあります。そこで働く酵素として見つかったため、「制限酵素」という名前がつけられました。大腸菌は、侵入者の DNA を切断・分解することで自らの身を守っていたのです。その後の研究により、制限酵素は大腸菌以外にも多くの細菌が持っていることが分かり、さまざまな DNA 配列を認識するものが発見されています。

本キットでは、*Haemophilus influenzae* Rd.が持っている制限酵素 *Hind* III を用いてラムダ・ファージ由来の DNA の配列を切断します。

制限酵素の性質

制限酵素は、特定の DNA の配列を認識し切断する酵素です。大部分の制限酵素は 4 塩基、6 塩基または 8 塩基の、特定の DNA の配列を認識し、切断します。

制限酵素の大きな特徴は、その認識する DNA の配列がパリンドローム(回文)構造をとっていることです。パリンドローム構造とは、「シンブンシ(新聞紙)」のように前から読んでも後ろから読んでも同じことを指しますが、2 本鎖の DNA におけるパリンドローム構造とは下図のような配列(灰色四角)を指します。制限酵素 *Hind* III は下図のパリンドローム配列(赤字)を認識して特定の箇所(点線の部分)で切断します。



付録 2 電気泳動の原理

アガロースゲル電気泳動法とは？

アガロースゲル電気泳動法は、DNA や RNA などの核酸をそれらの電氣的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「マイナス」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース(※)のゲルの網目構造内(ゲルマトリックス)を＋極側に移動します。アガロースゲル電気泳動法では、長い DNA 断片はゲルマトリックス内をゆっくりと(引っかかりながら)動くのに対して、短い DNA 断片はより速く(あまり引っかかりずに)動くことから、DNA 断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究において DNA 断片の精製の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える基本的な技術です。

※アガロースとは？

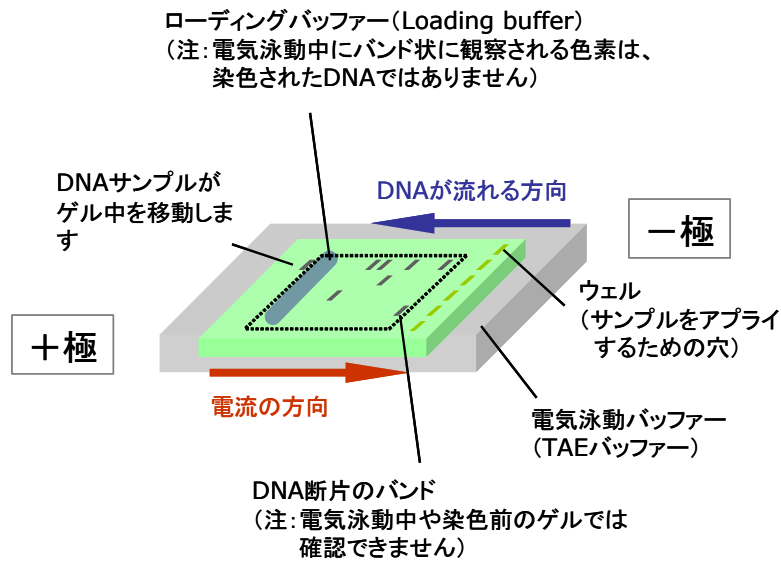
アガロースは、「寒天」の主要な成分です。2 種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特に DNA を分離する際によく利用されます。

DNA の電氣的性質

DNA は、リン酸基・塩基・デオキシリボース(糖の一種)によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNA の場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがって DNA はヌクレオチド数、すなわち分子量(※)に比例したマイナスの電荷を持っていることになります。

※DNA はヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します(塩基の種類によって多少の誤差が生じます)。一般的に DNA の大きさは分子量で表さずヌクレオチドの長さ(塩基対数、base pair:bp)で表します。



上図は、アガロースゲル電気泳動法の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン型電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつ DNA の分解が起こりにくい電気泳動バッファーで満たし、その中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルをアプライするための穴があり、マイクロピペットを用いてここに DNA サンプルをアプライします。

DNA サンプルを電気泳動する際には、あらかじめ DNA サンプルをローディングバッファーと混和します。これにより DNA サンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルに DNA サンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめ DNA 断片のサイズの分かっている DNA マーカーを「DNA のモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA 断片を可視化するために染色します。DNA 染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド (EtBr)、Mupid Blue などが挙げられます。EtBr は検出感度に優れていますが、DNA の 2 本鎖の間に入り込む (インターカレーションする) 物質であり、発

がん性が認められます。また、DNA 断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全な Mupid Blue の DNA 染色液の使用を推奨します。

電気泳動バッファー

DNA の電気泳動では、一般に TAE バッファーや TBE バッファーが用いられます。TAE バッファーは数千 bp 以上の比較的長い DNA 断片の分離に適しているのに対して、TBE バッファーはそれよりも短い DNA の分離に適しています。

アガロースゲルの濃度

電気泳動法による DNA の分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が上がれば上がるほどゲルマトリックス分子と DNA 断片の相互作用は強くなり DNA 断片の移動度が小さくなるため、より細かい DNA 断片の分離が可能となります。分離したい DNA 断片の長さによって適当なアガロース濃度を選択することが大切です。本キットでは、0.7 % のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

アガロース濃度 (%)	分離できる DNA 断片の長さ (bp)
0.6	1,000~20,000
0.7	800~10,000
1.0	500~7,000
1.2	400~6,000
1.5	200~3,000
2.0	100~2,000

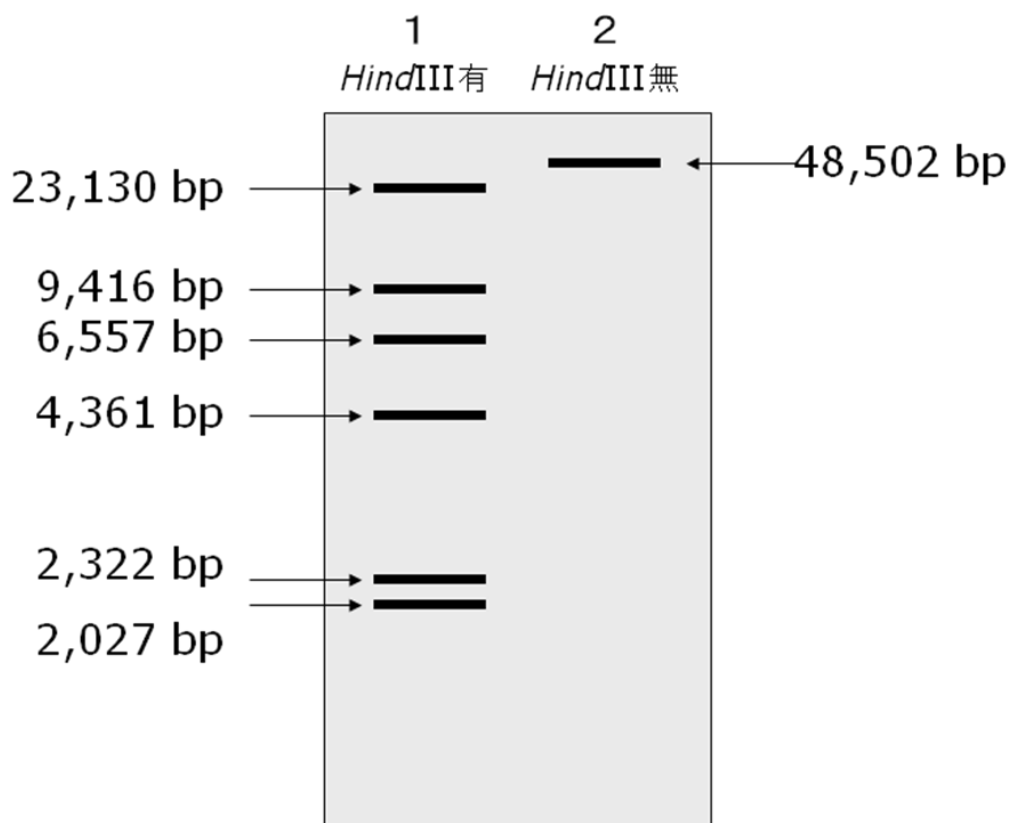
付録3 予想されるバンド像

Hind III はラムダ DNA を 7 箇所 で切断する

Hind III はラムダ DNA の中にある AAGCTT という配列を認識し切断します。このような DNA 配列はラムダ DNA の中に 7 箇所存在しています。つまり *Hind* III による切断後には 8 本の DNA 断片が存在することになりますが、アガロースゲル電気泳動法では、これらのうち 6 本のバンドについて目で確認することができます (2 本については DNA 断片が短いため、0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動での確認は難しくなっています)。

下図に、6 本のバンドの長さのアガロースゲル電気泳動でのバンド像を示します。バンド像はアガロースの濃度によって、多少変化します。

(bp は base pare (塩基対) の略で塩基の長さを表すときに用いられます。)



付録4 いろいろな制限酵素

制限酵素は 100 種類以上存在する

細菌は種類によって、認識する DNA 配列の異なる制限酵素を持っています。本キットで使用した *Hind* III 以外にも 100 種類以上の制限酵素がこれまでに発見され、遺伝子工学用の酵素試薬として販売されています。

下表では、その中から6塩基のDNA配列を認識し切断する代表的な制限酵素を示しています。認識配列の1文字目とそれに対応する6文字目が縦軸に、2、3文字目とそれに対応する5、4文字目が横軸になっています(本キットで用いたAAGCTTを認識するHind IIIを赤字で示しています)。

[illegible]

付録5 マイクロピペットの使い方

マイクロピペットは、微量の液体を正確に測り取るための器具です。使用方法はメーカーによって多少異なります。ここでは最も一般的なものについて説明します。

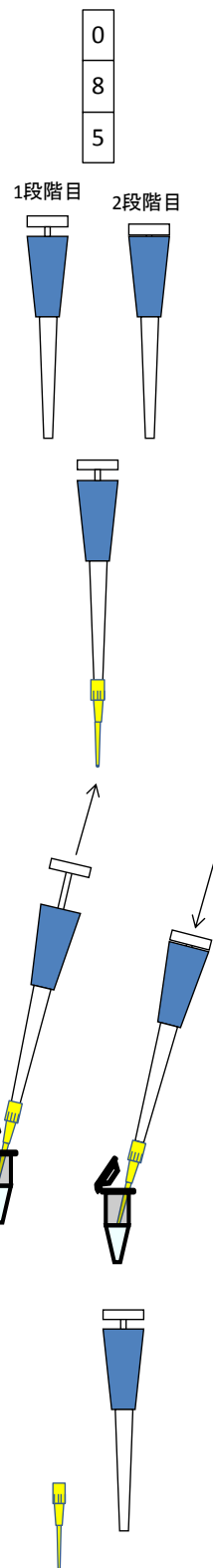
- 1) 目盛りを見ながら、数値が測り取りたい量になるまでダイヤルを回してください。目盛りは、200 μl 用の場合は上から百の位、十の位、一の位、20 μl 用の場合は十の位、一の位、1/10 の位になっています。例えば図のような目盛りの場合、200 μl 用だと 85 μl 、20 μl 用だと 8.5 μl を示していることになります。

シャフトには軽い力で押し込める 1 段階目と、強い力で押し込める 2 段階目があるので、まずはそれを確認してください。試薬を取る際は 1 段階目で止めます。2 段階目まで押し込んでしまうと、設定した容量よりも多くの液体を吸ってしまいます。

- 2) マイクロピペットの先端をチップの口に押し込み、しっかりとチップをはめてください。これで準備は完了です。
- 3) シャフトを 1 段階目まで押し込んだ状態で、チップの先端を溶液中に入れてゆっくりとシャフトを上げると、チップ中に溶液が入っていきます。

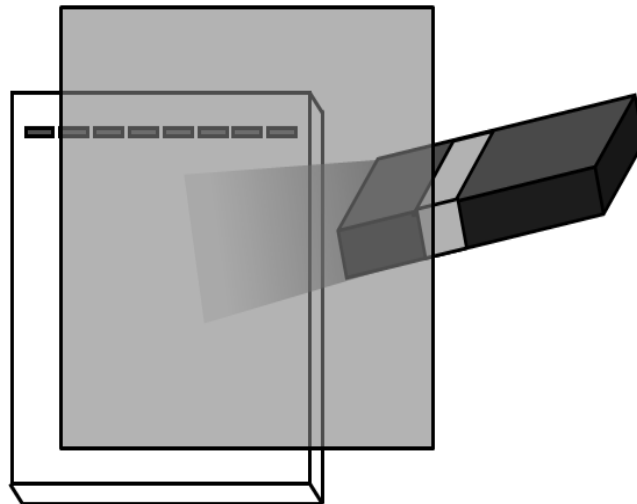
※ここで一気にシャフトが上がると、チップ中に空気が入りやすくなりますので注意してください。

- 4) 溶液を吸ったチップの先端を新しいチューブに入れてシャフトを押し込むと、溶液をはき出せます。このとき溶液を完全にはき出すために、シャフトを 2 段階目まで押し込んでください。シャフトを押したままチップの先を液体から出します。
- 5) 使用済みのチップをマイクロピペットから外して捨ててください。溶液の混入をふせぐため、異なる溶液を取る際は必ずチップを交換してください。



付録 6 DNA 観察の推奨方法

泳動槽からゲルを取り出し、青色LEDライト(ブラックライト、紫外線でも可能)の光を当てます。ライトを当てている上から蛍光観察フィルム(黄色、セロファンでかまいません)をかぶせ、フィルムの上から観察します。



Feel so Bio キットシリーズ

バイオレスキューFAX問合せ票

ご記入後
03-6277-8042
へご送付ください

<お客様情報>

お名前	学校名
ご連絡先:TEL	FAX

<ご利用いただいたキット>

- | | |
|---|-------------------------------------|
| ☐ DNA抽出キット | ☐ PCRキット |
| ☐ DNA切断キット | ☐ DNA結合キット |
| ☐ 遺伝子組換えキット | ☐ 生物発光キット |
| ☐ DNA鑑定キット | ☐ DNA電気泳動キット |
| ☐ 蛍光タンパク質遺伝子組換えキット | ☐ タンパク質泳動キット |

<お問い合わせ内容>

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| ☐ 準備方法について | ☐ 実験方法について |
| ☐ 実験結果について | ☐ 内容物について |
| ☐ 授業での活用方法について | ☐ その他() |

<お問い合わせ内容について詳細お書きください>

ご利用ありがとうございます。担当者より追ってご連絡いたします。

Feel so Bioシリーズ カスタマーサポート係
TEL:03-6277-8041 FAX:03-6277-8042
Mail:order@leaveanest.com



Leave a Nest

免責事項

本製品は、教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載された手順以外でのご使用につき発生したいかなる損害に関して、当社は一切の責任を負いません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

アフターサポート「バイオレスキュー」

ご購入後 3 ヶ月間(ご購入月を含む)無料でご利用いただける、アフターサポートサービスです。大学や研究機関等で研究に携わる、若手研究者が実験手順や先端科学に関する知識面のサポートをいたします。

サポートを担当するのは、リバネスが実施する先端科学実験教室のノウハウを持つスタッフでもありますので、授業内で行う実験カリキュラム等に関するご相談も承っております。気軽にご利用いただけるサービスですので、少しでもご不明な点がございましたらぜひご利用下さい。

Feel so Ecoシリーズ カスタマーサポート係

TEL:03-6277-8041

FAX:03-6277-8042

Mail:ed-kit@leaveanest.com

※FAX をご利用の場合は、同封の FAX 用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元



Leave a Nest

お問い合わせ先

〒160-0004

東京都新宿区四谷 2-11-6 VARCA 四谷 10F

TEL 03-6277-8041

FAX 03-6277-8042

URL: <http://www.leaveanest.com/>

